

На правах рукописи

Водунон Сирил Алоде Джуниор

**ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Казань-2008

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина».

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Абрамова Зинаида Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Семенов Валерий Васильевич
(заведующий кафедрой медицинской биологии и
генетики Казанского медицинского университета,
г.Казань)

доктор биологических наук,
Сергей Юрьевич Егоров
(профессор кафедры микробиологии Казанского
государственного университета, г. Казань)

Ведущая организация: ГОУВПО «Казанская государственная
медицинская академия»

Защита диссертации состоится «11» «декабря» 2008 года в 13 часов на заседании специализированного Диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском государственном университете им. В. И. Ульянова-Ленина» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «_____» «_____» 2008 г.

Ученый секретарь, д.б.н.

Абрамова З.И

Актуальность работы. Апоптоз представляет собой высоко регулируемую форму запрограммированной клеточной гибели с характерными морфологическими, биохимическими и генетическими признаками, в результате которой достигается конечная цель - смерть клетки. Механизмы регуляции апоптоза очень сложны и практически не изменились в процессе эволюции, что дает основание судить о фундаментальной биологической роли этого процесса (Варга, 2007; Манских, 2007; Григорьев, 2003; Владимирская, 2002). Апоптоз играет важную роль как в морфогенетических процессах, так и в регуляции численности клеток на протяжении всего онтогенетического развития многоклеточного организма (Варга, 2007; Lenardo, 1995). Кроме того, он защищает организм от персистенции поврежденных и цитотоксических клеток, которые могут оказаться потенциально опасными для организма (Варга, 2007).

Исследование молекулярных механизмов апоптоза клеток стало в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем медико-биологических наук. До сих пор, не до конца выяснены пути регуляции апоптоза отдельных клеток в целостном многоклеточном организме. Актуальность проблемы заключается и в том, что возникновение самой патологии связывают с нарушением процесса запрограммированной клеточной гибели (Москалева, Северин, 2006; Белушкина, Белецкий, 2004; Frassantino, 1998; Рыжов, Levine, 1994). Что особо важно, возникновение тяжелых заболеваний связывают с такими нарушениями, при которых клетки либо перестают погибать (Frassantino, 1998; Рыжов, Levine, 1994), и тогда возможно возникновение опухолей, либо гибель захватывает избыточное число клеток, что является патогенным фактором в развитии другого ряда заболеваний, среди которых аутоиммунные и иммунодефицитные состояния.

Активно изучается роль апоптотического механизма иммуносупрессии в патогенезе аллергических заболеваний. Повышенный интерес обусловлен концептуальной версией, согласно которой в основе иммунных заболеваний лежит чрезмерная активация иммунокомпетентных клеток, которая приводит к накоплению аутореактивных клонов (позитивная активация и отсутствие апоптоза) (Каладзе, 2004, Чернушенко, 2003; Сепиашвили, 2000). Специфический воспалительный процесс в бронхиальной стенке при астме, характеризуется увеличением в слизистой оболочке и просвете бронхиального дерева активизированных эозинофилов, тучных клеток, макрофагов и Т-лимфоцитов (Гавалов, 2001). Воспаление респираторных путей характеризуется потерей клеток эпителия бронхов (Trautmann et al., 2002), которое сопровождается ДНК-фрагментацией и характерными изменениями, присущими апоптозу, и этот процесс активируется Т-клетками и эозинофилами. Предполагают, что апоптотическая гибель большинства Т-лимфоцитов связана с их миграцией в результате антигенного воздействия, то есть апоптоз Т-клеток представляется авторами как механизм антигенуправляемой селекции лимфоцитов (Барышников, Шишкин, 1996; Urboniene et al., 2005; Rottem et al., 2002). А пролонгацию аллергического воспаления при бронхиальной астме

связывают с усилением выживаемости Т-лимфоцитов и утратой ими способности к апоптозу (Шапорова, 2003), что проявляется в замедлении процессов фрагментации ДНК этих клеток (Vignola, 2000; Melis et al., 1997; Thomas, 1992).

Одним из значительных в этом направлении исследований стала работа Vignola A.M. с соавторами (Vignola et al, 2000), в которой в экспериментальной системе с применением иммуногистохимического и TUNEL методов показали наличие апоптотических эозинофилов, макрофагов и лимфоцитов в тканях дыхательных путей здоровых людей и больных хроническим бронхитом. Сравнивая здоровых людей с двумя группами больных бронхиальной астмой (получавших и не получавших стероиды) Druilhe A. и соавторы (Druilhe et al, 1998) исследовали процесс апоптоза и экспрессию апоптоз-регулирующих молекул в эозинофилах и лимфоцитах тканей дыхательных путей. Авторы сообщили о наличии TUNEL-положительных эозинофилов и лимфоцитов в трех исследуемых группах, но не обнаружили достоверной разницы между группами. Не была представлена информация относительно апоптотических изменений в клетках, полученных с помощью световой и электронной микроскопии.

Противоположным процессу апоптоза является процесс пролиферации. Соотношение апоптоза и пролиферации при этом служит важным параметром реакции на антигены, так как оно определяет ее результативность с точки зрения развития иммунного ответа (Никонова и др., 1999).

Апоптоз сопровождается изменением целого ряда морфологических, биохимических и других показателей, касающихся практически всех клеточных структур. При анализе ДНК хроматина и ультраструктуры органелл поврежденных клеток выявляют разрывы цепи ДНК методом TUNEL (TdT-mediated dUTR-biotin nick end-labeling) и методом электрофореза в геле агарозы. На начальных этапах программируемой гибели в клетках, еще до начала формирования апоптотических телец, наблюдается нарушение мембранной ассиметрии, вследствие чего наружу экспрессируется фосфатидилсерин, что распознается при специфическом связывании методом проточной цитофлюориметрии (Григорьева и др., 2002).

Таким образом, проблема апоптоза лимфоидных клеток, идентификация его морфологических и биохимических маркеров в перспективе может способствовать более глубокому пониманию механизмов патогенеза астмы, улучшению и созданию принципиально нового направления дифференциальной диагностики.

Цель работы: Характеристика биохимических и морфологических признаков процесса апоптоза лимфоцитов периферической крови при atopической бронхиальной астме.

Задачи исследования:

1. Провести цитогенетический анализ форменных элементов крови у больных астмой с различной степенью тяжести.

2. Изучить динамику роста форменных элементов клеток *in vivo* и *in vitro*, на примере сравнительного анализа роста лимфоцитов периферической крови у больных астмой различной степени тяжести.

3. Провести сравнительный анализ морфологии выделенных лимфоцитов условно здоровых доноров и больных астмой методом трансмиссионной электронной и световой микроскопии.

4. Изучить биохимические особенности апоптоза:

а. Оценить степень деградации ДНК лимфоцитов выделенных из периферической крови электрофоретическим методом (фрагментация ДНК).

б. Определить уровень спонтанного и дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов на ранней и поздней стадии, используя нарушение мембранной ассиметрии (вследствие чего наружу экспрессируется фосфатидилсерин), фрагментацию ядер, что распознается при специфическом связывании методом проточной цитофлюориметрии.

Научная новизна работы. Впервые установлено, что у больных различными формами атопической бронхиальной астмой (легкая, средняя и тяжелая персистирующая астма) процесс апоптоза лимфоцитов имеет структурные и биохимические особенности. У больных легкой и средней персистирующей астмой на фоне торможения апоптоза повышается количество пролиферирующих лимфоцитов (отмечается лимфопролиферативный эффект). Для лимфоцитов больных тяжелой персистирующей астмой характерно нарушение клеточного деления лимфоцитов (митотической активности).

Начальные этапы апоптоза, выраженные через взаимосвязь между числом клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и экспрессией фосфатидилсерина на поверхности Т-лимфоцитов не претерпевают серьезных отличий в норме и при патологии. Нарушения апоптоза затрагивают заключительный этап на стадии деградации ДНК. У больных с тяжелой персистирующей астмой апоптоз идет по пути программированного некроза.

Практическая ценность работы. Полученные результаты расширяют представления о механизмах нарушения апоптоза лимфоцитов и прогноза тяжести заболевания астмой. Работа носит экспериментальный характер и может послужить фундаментом для дальнейшего поиска новых методов для диагностики и контроля тяжести астмы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Степень тяжести бронхиальной астмы отражена в морфологических проявлениях апоптоза лимфоцитов, связанного с заключительным этапом процесса в ядре.

2. При легкой и средней персистирующей астме увеличение продолжительности жизни лимфоцитов коррелирует с повышением пролиферативной активности на фоне торможения апоптоза.

3. Повышение уровня антител к ДНК при тяжелой персистирующей астме связано с гибелью лимфоцитов по типу программируемого некроза, сопровождающегося развитием альтерации окружающих клеток и воспаления,

а фагоцитоз остатков погибших клеток- развитием иммунного ответа, если в них имеются антигены хроматин-содержащие элементы клеток.

Апробация работы: Основные результаты исследований докладывались на конференции II Международного молодежного медицинского конгресса в Санкт Петербурге (2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов в Новосибирке (2008) и II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии».- Казань, 2008.

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации. Основной текст диссертации изложен на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы собственных наблюдений, обсуждения и выводов. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 32 рисунками. Список литературы содержит 215 источник: 87 в Российских изданиях и 128 зарубежных авторов.

Материалы и методы исследования

Объектом изучения послужили лимфоциты, выделенные из периферической крови условно здоровых доноров (ЗД) и больных atopической бронхиальной астмой (АБА) (109)- (мужчины/женщины: 69/40; возраст \pm SD: 31 ± 15). Группу больных АБА составили лица с различной степенью тяжести заболевания: 15 больных с интермиттирующим течением (32 ± 6); 38 больных с легким персистирующим течением (29 ± 14); 26 больных со средним персистирующим течением (32 ± 14); 30 больных с тяжелым персистирующим течением (42 ± 18), на момент забора крови не получавшие кортикостероиды, находящиеся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении РКБ МЗ РТ г. Казани. Диагноз atopической формы БА ставился на основании данных аллергического анамнеза, результатов кожных проб с бытовыми, эпидермальными, пыльцевыми аллергенами, провокационных назальных и ингаляционных тестов. Стандартное исследование периферической крови (общий анализ с лейкоцитарной формулой) проводилось в лаборатории пульмонологического отделения РКБ МЗ РТ г. Казани.

Подготовка мазков крови периферической крови. Мазки крови фиксировали неразбавленным раствором фиксатора-красителя (эозин метиленовый синий по Май-Грюнвольду фирмы «Абрис +», Россия). Материал окрашивался методом, рекомендованным фирмой-производителем стандартных гематологических красителей Май-Грюнвальда и Романовского-Гимза (Абрис +), в растворе азур-эозинового красителя Романовского-Гимза (1:10) на дистиллированной воде. Препараты высушивали на воздухе и просматривали под бинокулярным микроскопом «Micros MC 50» (окуляр-7, объектив-100x) с использованием масляной иммерсии.

Подсчет эритроцитов с микроядрами в периферической крови. Приготовленные мазки фиксировались в растворе метиловый спирт - ледяная

уксусная кислота (3:1) в течение 3 мин, затем высушивались. Окрашивались в растворе азу-эозинового красителя Романовского–Гимза (1:5) в течение 20 мин. Число эритроцитов с микроядрами пересчитывали в процентах.

Лимфоциты из периферической крови выделяли методом равновесного центрифугирования (Patel D et al., 1995) в растворе фиколл-верографина ($\rho=1,077$ г/см). Суспензию клеток собирали и промывали в растворе Хенкса. Рабочая концентрация лимфоцитов составляла 2×10^6 клеток в 1 мл.

Культивирование лимфоцитов. Клетки (2×10^6) суспензировались в среде RPMI 1640 из расчета 1 мл клеточной суспензии на 1 лунку, в 24-луночных пластиковых плоскодонных планшетах (Nung), далее добавлялась 10% эмбриональная телячья сыворотка и 200 мкг/мл L-глутамин (Flow). Культивировали с дексаметазоном (конечная концентрация 10^{-4} М) в CO_2 -инкубаторе (5 %-ным CO_2) в течение 1-6 суток (Бойчук, 2003).

Ультраструктурное исследование проводилось на осажденных центрифугированием лимфоцитах, которые последовательно фиксировали в 2,5%-ом глutarовом альдегиде на 0,1М Na-фосфатном буфере (pH 7,2) и 1%-ом растворе OsO_4 в течение 1 ч. Полученные образцы заключали в Эпон-812. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-III (Швеция), просматривали на электронном микроскопе Hitachi HU-125E (Япония).

Выделение ДНК из лимфоцитов. Осадок лимфоцитов суспензировали в 1 мл денатурирующего раствора охлажденного сахарозного буфера (Джербашьян, 2002), выдерживали 10 мин при комнатной температуре (Иващенко, 1999). Образец центрифугировали при 3000 об/мин, при 4°C в течение 15 мин. Осадок ядер суспензировали в 400 мкл буфера для протеиназы К, и добавляли: 20 мкл 10% SDS-Na до конечной концентрации 0,5%, 5 мкл маточного раствора протеиназы К до конечной концентрации - 250 мкг/мл. ДНК экстрагировали с помощью смеси фенол-хлороформа (1:1) (Джербашьян, 2002) и осаждали изопропиловым спиртом. Концентрацию и степень чистоты образцов ДНК определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение образца при 260 и 280 нм.

Электрофорез в 1% агарозном геле. В лунки вносили образцы, содержащие одинаковое количество ДНК, добавляли по 2 мкл бромфенолового синего. Электрофорез вели в горизонтальном направлении на пластинах размером $10 \times 11 \times 3$ мм при напряжении 5 В/см, в течение 3,5 ч при 20°C в электродном буфере, содержащем бромистый этидий (2 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете (видеосистема для регистрации гелей “DNA Analyzer”).

Определение доли клеток со сниженной величиной митохондриального потенциала (МП) измеряли с помощью флюорохрома CMX-ROS. 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^6 клеток/мл среды (конечная концентрация CMX-Ros 5 мкг/мл). Суспензию инкубировали в темноте 30 мин при 37°C в полистирольных пробирках для цитофлуориметрии 12×75 мм (Falcon 2052). Регистрацию результатов проводили на третьем детекторе флуоресценции FL3 (красная область спектра). На каждый вариант опыта

просчитывали не менее 10000 клеток. Мёртвые клетки исключали из исследования на основании параметров их прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

Определение доли клеток с экспрессией фосфатидилсерина (ФС). Маточный раствор MC540 (1 мг/мл) в объёме 5 мкл вносили в 1 мл клеточной суспензии, содержащей 10^6 клеток/мл (конечная концентрация MC540 5 мкг/мл) (Mower D, 1994). Клеточную суспензию инкубировали в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре в полистирольных пробирках 12×75 мм (Falcon 2052). Регистрацию результатов осуществляли на втором детекторе флюоресценции FL2 цитометра. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток.

Определение доли клеток с гиподиплоидным содержанием фрагментированной ДНК. Количество клеток на стадии апоптоза оценивали по доле клеток формирующих гиподиплоидную область при окрашивании образцов PI (“Sigma”). Клетки, предварительно фиксированные в течение 1 ч 70° этиловым спиртом и отмытые ФСБ, окрашивали на ДНК при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте гипотоническим раствором PI, содержащим 0,1% тритона X-100 и 0,1% цитрата натрия, в полистирольных пробирках 12×75 мм (Falcon 2052) (Бойчук, 2003). Определяли процент клеток в гиподиплоидной зоне гистограммы (2), располагающегося левее основного пика (1), соответствующего диплоидным клеткам. Регистрацию результатов проводили на втором детекторе флуоресценции - FL2 (Nicoletti, 1991).

Статистическая обработка. Математический анализ полученных результатов проводился на персональном компьютере с использованием пакета программ “Excel (Microsoft office 2003)” и Statistica 5,0”. Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса и Т-критерия Манна – Уитни. Достоверность различия частоты встречаемости признака определяли, используя метод Фишера и t-тест для долей с поправкой Бонферрони. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена- r_s .

Результаты исследования и их обсуждение

Цитогенетический анализ и количественная характеристика форменных элементов периферической крови при развитии тяжести астмы *in vivo*

На клеточном уровне поддержание биологической целостности организма реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, которые поддерживают состояние равновесия между интегративными физиологическими процессами: пролиферацией, дифференцированием и программированной клеточной гибелью. Функция апоптоза заключается в отслеживании нарушений в клетке, которые могут привести к изменению цитогенетического аппарата. Одним из анализов нестабильности хромосом человека является микроядерный тест. Учет микроядер, по мнению исследователей (Ковалева, 2008), стал возможен в большинстве популяций

делящихся клеток одного организма, в том числе и лимфоцитах. Однако оценка микроядер в одноядерных лимфоцитах с их относительно большей продолжительностью жизни может вносить ошибку в анализ, так как учитываются и индуцируемые микроядра и предсуществующие (Романова и др., 2000). Динамика двухъядерных клеток или двухъядерных клеток с микроядрами в популяции остается недостаточно исследованной (Pertusa et al., 1965), поэтому легче всего их выявлять в клетках без основного ядра у большинства видов млекопитающих - в эритроцитах.

Лимфоциты и эритроциты относятся к форменным элементам крови, которые отражают состояние защитных сил организма (Глобальная стратегия лечения и профилактики астмы, 2002), поэтому мы изучали показатели общего анализа крови у больных АБА, в том числе динамику клеток лейкоцитарных рядов и цитогенетические аномалии.

Проведя микроядерный анализ эритроцитов периферической крови, мы обнаружили достоверное увеличение числа эритроцитов, содержащих микроядра (табл.1).

Таблица 1. Уровень эритроцитов с микроядрами в периферической крови больных атопической бронхиальной астмой

Группы доноров		Число	Изучено	Эритроциты с микроядрами:		P
		обследованных		клеток	абс. число	
Здоровые		17	34000	7	0,021±0,002	-
а						
с	легкая	14	28000	10	0,036±0,002	Н.З.
т	средняя	15	30000	16	0,053±0,003	≤0,001
м	тяжелая	10	20000	18	0,090±0,004	≤0,001
а						

Увеличение количества эритроцитов с микроядрами периферической крови наблюдалось у всех больных и коррелировало с тяжестью атопической бронхиальной астмы. По данным литературы (Okada, Mak, 2004), образование одного или нескольких микроядер в клетках, в которых отсутствуют явления маргинации и конденсации хроматина, понимают как процесс гибели клетки отличный от апоптоза и получивший название митотическая катастрофа. Морфологический и биохимический механизм гибели клетки, претерпевшей митотическую катастрофу, обычно описывают как некроз (Roninson et al., 2001).

Если экстраполировать результаты на лимфоциты, интерпретация данных, полученных этим методом, в значительной мере определяется решением вопроса о дальнейшей судьбе клетки, содержащей микроядра.

Мы изучили поведение некоторых форменных элементов крови *in vivo*. В клинике имеет значение не только общее количество лейкоцитов, но и процентное соотношение всех видов лейкоцитов. С помощью световой микроскопии мы дифференцировали клетки лейкоцитарных рядов.

Изменения лейкоцитарной формулы сопутствуют многим заболеваниям и нередко являются неспецифическими. Тем не менее, оно дает представление о тяжести состояния пациента, эффективности проводимого лечения. По полученным нами данным, световая микроскопия не показала значительных отличий в морфологии форменных элементов крови в зависимости от тяжести заболевания, поэтому мы изучили динамику количества этих клеток *in vivo*.

Как известно, у здорового человека в норме число лейкоцитов в 1 л крови составляет $6,0-9,0 \times 10^9$ (Kogg, Doerschuh, 1995). При atopической астме суммарное количество лейкоцитов ($6,18 \times 10^9$) в крови практически не отличается от количества лейкоцитов здоровых доноров, однако при изучении отдельных групп клеток выяснилось, что на фоне достоверного повышения числа нейтрофилов ($p=0,04$) и эозинофилов ($p=0,26$), но не отражающего взаимосвязи с тяжестью патологии, обращает на себя внимание пониженное содержание числа лимфоцитов. Особенно динамика к снижению числа лимфоцитов была отмечена при развитии тяжести патологии. Использование непараметрического Т-критерия Манна-Уитни и соответствующих структурных единиц (медиана и перцентили) показало, что различия в числе лимфоцитов в периферической крови между легким и тяжелым персистирующим течением астмы достоверны на уровне значимости 95% ($p=0,05$). Методом корреляционного анализа установлено, что существует обратная корреляционная зависимость между количеством лимфоцитов и степенью тяжести заболевания ($r = - 0,3$, $p = 0,04$, $R^2=0,0734$, $n=49$).

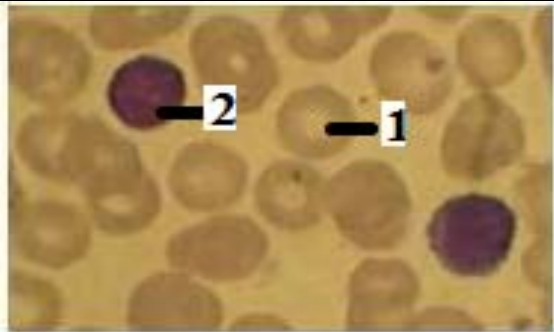

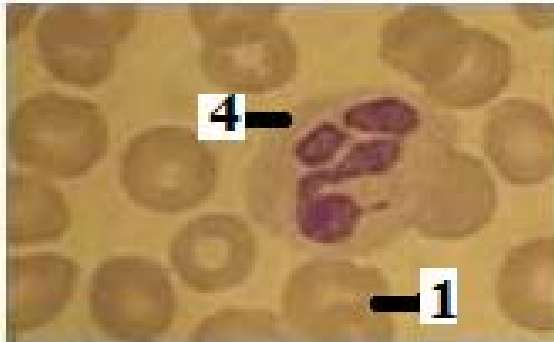
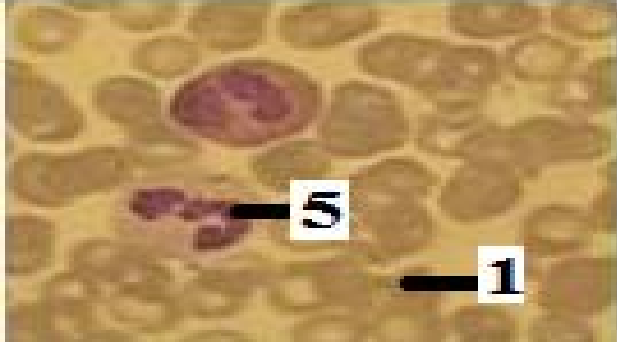
Снижение, может быть связано как с нарушением пролиферативной активности лимфоцитов, так и миграцией последних из периферической крови к легким после воздействия аллергена. С другой стороны пролонгацию аллергического воспаления при бронхиальной астме связывают с утратой ими способности к апоптозу и, как следствие, увеличению продолжительности их жизни.

Для объяснения фактов полученных *in vivo*, мы изучили ряд биохимических параметров клеток при развитии *in vitro* (в культуре лимфоцитов больных астмой различной степенью тяжести).

Особенности роста лимфоцитов при культивировании *in vitro*

Учитывая, что на клеточном уровне изменения проявляются значительно раньше, чем на организменном, представляется весьма актуальным сравнительный анализ морфологических особенностей структур лимфоцита в норме и при различной степени тяжести астмы. Нами установлено, что структура лимфоцитов периферической крови больных по большинству параметров значительно отличается от нормы (рис.1). Если при окраске эозином апоптоз определяется в единичных клетках - апоптотические клетки выглядят как округлые или овальные скопления интенсивно эозинофильной цитоплазмы с плотными фрагментами ядерного хроматина, то при электронной микроскопии выявляются четкие отличительные морфологические признаки.

Таблица 2. Изменения структуры лейкоцитарной формулы периферической крови пациентов с atopической астмой в зависимости от тяжести заболевания.

				<div>1-эритроциты</div> <div>2-лимфоциты</div> <div>3-моноциты</div> <div>4-нейтрофилы</div> <div>5-эозинофилы</div>				
								
Степень тяжести астмы→	Интермиттирующая	Персистирующая:			АБА ($6,18 \times 10^9/\text{л}$)	N, $6,3 \times 10^9/\text{л}$	P	
		легкая	средняя	тяжелая				
Клетки↓ :	Количество клеток в %:							
лимфоциты	28,8	37,8	25,4	17,3	27.3	30	↓	0,05
нейтрофилы	61,9	52,4	65	74,6	63.5	59	↑	0,04
моноциты	5,9	4,5	6,5	5,8	5.7	6,6	↓	0,03
эозинофилы	3,7	5,4	4,8	4,3	4.6	2,5	↑	0,26

Уплотнение цитоплазмы, более компактное расположение органелл, лимфоциты больных астмой отличаются от контрольных клеток крупными ядрами и сегрегацией ядрышек. Выявляются и апоптотические лимфоциты с выпячиваниями поверхности клетки и бляшками на мембране. Ядра



Рис.1. Морфология лимфоцитов здоровых доноров (норма) и больных легкой, средней и тяжелой персистирующей астмы *in vivo*.

приобретают лопастной вид, отмечается маргинация хроматина, сущность которой в концентрации последнего по периферии ядра в виде глыбок. Более выраженные отличия выявляются в клетках больных тяжелой формой астмы: часто отмечается фрагментация ядер и их отшнуровывание мембраной внутри клетки.

В связи с этим возникает вопрос, как ведут себя лимфоциты с такой структурой в процессе роста. Исследование апоптоза в эксперименте *in vitro* с использованием клеточных культур дает сегодня возможность для более глубокого понимания молекулярных нарушений и кинетики этого процесса при развитии atopических заболеваний (Мамонтова, 2005). В большинстве культуральных систем лимфоциты гибнут путем апоптоза на протяжении нескольких дней, поэтому срок появления лимфоидных клеток при atopической бронхиальной астме разных степеней тяжести, которые перешли в состояние апоптоза, представляет практический интерес.

Мы изучили изменение числа клеток в культуре лимфоцитов *in vitro*.

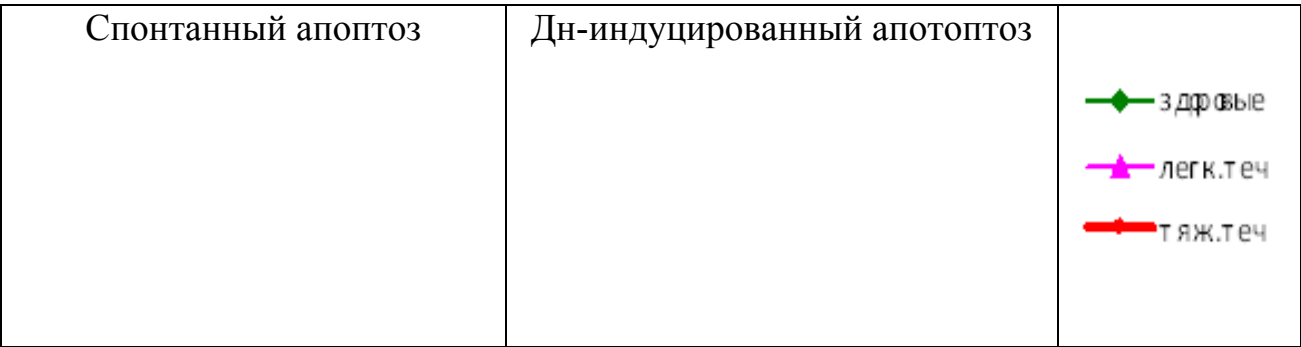
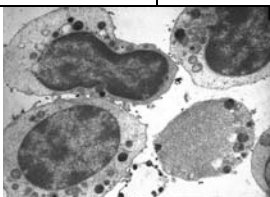

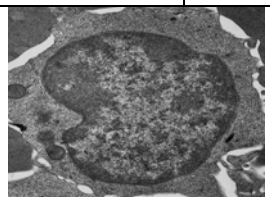
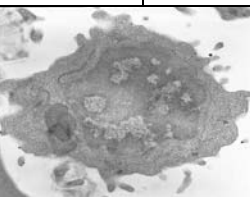
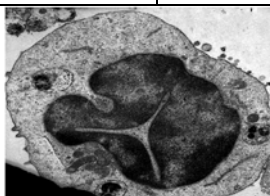


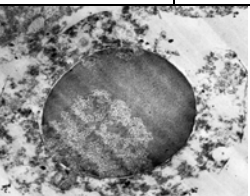


Рис.2 . Динамика изменения роста клеток *in vitro*

Уровень клеток (рис.2), обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне гистограмм на 3 сутки, мы сравнивали с числом клеток перед культивированием, а на 6 сутки - с количеством клеток на 3 сутки культивирования. Как следует из табл. 3, количество лимфоцитов на 3 сутки

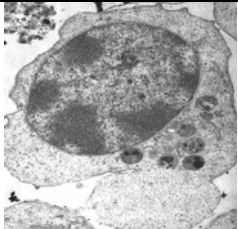
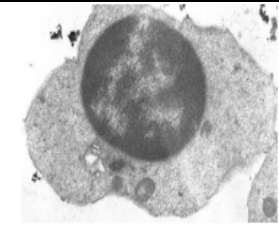
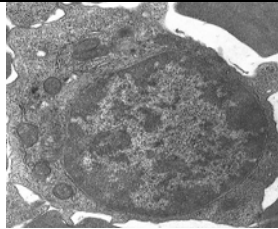
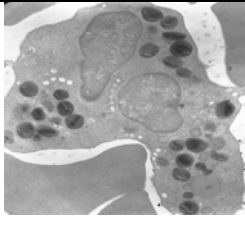
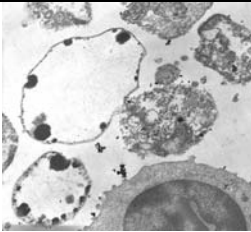
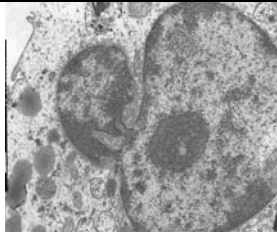
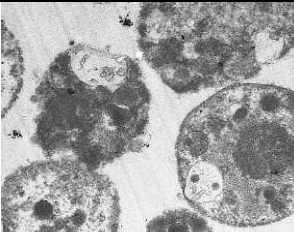
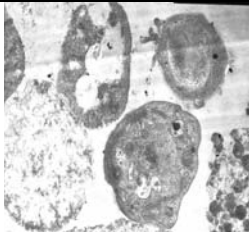
увеличивается (при спонтанном апоптозе) на 45 % в культуре здоровых клеток и на 58 - 70% при легкой и средней персистирующей астме, соответственно.

Таблица 3. Изменение количества лимфоцитов в норме и при астме *in vitro* после 3 дней культивирования без и с дексаметазоном (Дн).

Исходное количество клеток-2 млн/мл									
3		норма		Степень тяжести астмы:					
С У Т К И	легкая			средняя		тяжелая			
	2,9±0,22	> 45	3,1±0,11	> 58	3,4±0,37	> 70	2,3±0,1	> 15	
									
	2,1±0,2	>5%	2,7±0,13	>33	2,4>±0,28	>20	1,8±0,14	<10	
									

При использовании дексаметазона в норме число клеток на 3 сутки увеличилось только на 5%, что может свидетельствовать о подавлении клеточного роста.

Таблица 4. Изменение количества лимфоцитов в норме и при астме *in vitro* после 6 дней культивирования без и с дексаметазоном (Дн).

Исходное количество клеток – 2 млн/мл									
6		норма		Степень тяжести астмы:					
				легкая		средняя		тяжелая	
С У Т К И		1,0±0,12	<65	1,9±0,2	<38	2,1±0,2	<37	0,8±0,14	<65
									
	Дн	0,6±0,1	<71	1,0±0,2	<47	1,4±0,17	<42	0,4±0,1	<77
									

В культуре лимфоцитов легкой и средней степени тяжести клетки продолжали расти, но пролиферативная активность лимфоцитов несколько снижалась (число клеток увеличилось на 33-20 %, соответственно), что можно объяснить гибелью клеток в результате индуцированного апоптоза.

На 6 сутки (табл. 4) отмечалось снижение числа клеток в культуре лимфоцитов в норме и больных астмой.

Обращает на себя внимание поведение клеток в культуре лимфоцитов больных тяжелой персистирующей астмой: если без дексаметазона число клеток на 3 сут увеличивается в среднем на 15%, то добавление индуктора апоптоза приводило к снижению числа лимфоцитов на 10% по сравнению с числом клеток до культивирования.

Таким образом, *in vitro* число лимфоцитов изменяется в зависимости от времени роста как в культуре клеток от условно здоровых доноров, так и в культуре клеток от больных atopической бронхиальной астмой и говорит о разной степени выживаемости клеток в зависимости от тяжести заболевания.

Однако, с одной стороны, по данным нашего исследования выявлена обратная корреляционная связь между числом лимфоцитов в периферической крови и тяжестью астмы *in vivo*, с другой стороны, на фоне торможения роста клеток в культуре лимфоцитов больных тяжелой персистирующей астмой, лимфоциты от больных легкой и средней тяжести заболевания *in vitro* проявляют пролиферативную активность. По данным Минеева с соавторами (Минеев и др, 2003) апоптоз и пролиферация – процессы полярные.

В какой форме и на каком этапе развития апоптоза лимфоцитов может проходить нарушение этого процесса у больных atopической бронхиальной астмой? Для ответа на данный вопрос мы изучили основные проявления апоптоза на биохимическом уровне, которые протекают в митохондриях и в ядре:

- степень деградации ДНК лимфоцитов, выделенных из периферической крови электрофоретическим методом .

- определение уровня спонтанного и дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов на ранней и поздней стадии, используя нарушение мембранной асимметрии (вследствие чего наружу Т-лимфоцитов экспрессируется фосфатидилсерин) и фрагментацию ядер, что распознается при специфическом связывании йодида пропидия методом проточной цитофлуориметрии.

Идентификация биохимических маркеров апоптоза лимфоцитов *in vitro*

При апоптозе ДНК деградирует с образованием упорядоченных фрагментов, которые обнаруживаются по увеличению гиподиплоидной зоны ДНК на гистограммах в процессе цитофлуориметрии. Уровень апоптотических клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной зоне гистограмм, сравнивали с количеством клеток в культуре лимфоцитов условно здоровых и легкой и тяжелой формами астмы на 3 и 6 сутки культивирования (рис. 3).

При изучении механизмов апоптоза большое внимание уделяется митохондриям, так как в процессе ПКГ из них выделяется большое количество биологически активных веществ, необходимых для перехода апоптоза в конечную и необратимую стадию (Бойчук, 2003). Хорошо известно свойство митохондрий - четко выраженная взаимосвязь ультраструктуры и функционального состояния этих структур. Исчезают протяженные митохондриальные филаменты, мелкие округлые митохондрии концентрируются в зоне ядра, кристы меняют конфигурацию.

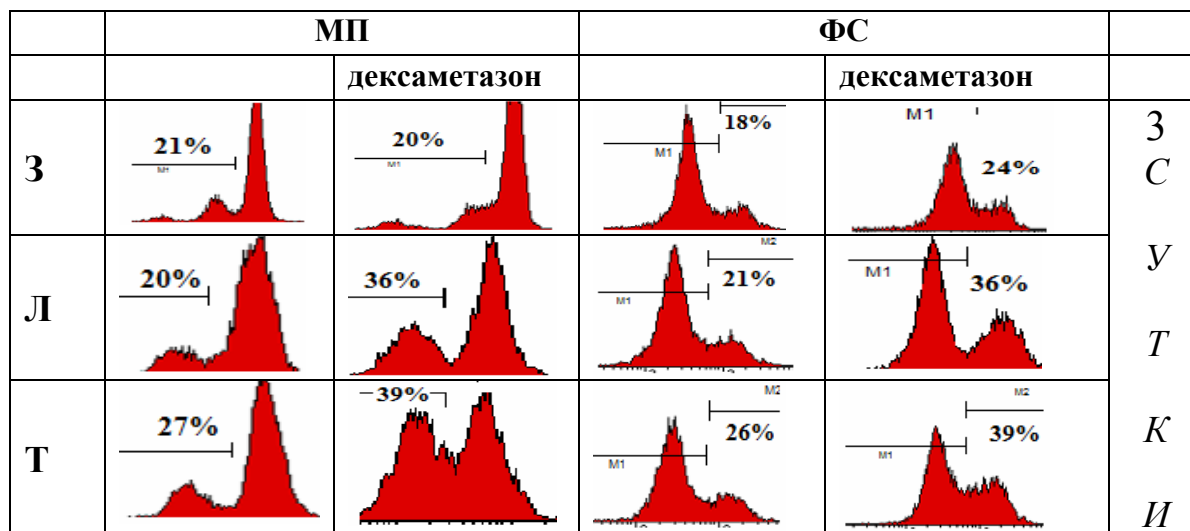


Рис. 3. Изменение величины митохондриального потенциала (МП) и фосфатидилсерина (ФС) в лимфоцитах доноров (З) и больных с легкой (Л) и тяжелой (Т) персистирующей atopической астмой, отражающих ранние признаки апоптоза.

(В % выражено число клеток со сниженным МП потенциалом и экспрессией ФС).

Мамонтова Т.В. и Кайдашев И.П. (2005) показали явление проникновения митохондрий в ядро (обнаруженное в отдельных случаях и в данной работе). По мнению авторов «ядерные митохондрии», как признак апоптоза, нашли подтверждение при апоптозе растительных клеток. Биохимические изменения в митохондриях являются одним из наиболее ранних событий, происходящих в клетках во время апоптоза (Metivier, 1998).

При исследовании клеточного роста нами установлено (рис. 3), что различий в спонтанном изменении показателей МП между исследуемыми группами на 3 сутки (табл. 5) не было выявлено. Клетки здорового организма проявляли устойчивость к Дн-индуцированному апоптозу через 72 ч (табл. 6).

Таблица 5. Изменения числа клеток (в %) *in vitro* на стадии ранних признаков апоптоза в норме и при патологии

Форма астмы	Число клеток в % на 3 сутки культивирования		
	-	(действие Дн в %):	
здоровые	21%	20%	(нет)
легкая	20%	30%	(больше на 30%)
тяжелая	27%	39%	(больше на 44%)

На 6 сутки (табл. 6) при спонтанном апоптозе в норме увеличивается ответ в виде повышения числа клеток со сниженным МП, что может быть связано с нарушениями, которые происходят в культуре клеток (*in vitro*). Активно пролиферирующие клетки в культуре лимфоцитов больных легкой формой астмы отвечают повышением числа клеток со сниженным МП (на 110%). Не делящиеся клетки больных тяжелой формой астмы отвечают практически отсутствием апоптотических изменений (табл.6) .

Таблица 6. Сравнение спонтанного и индуцированного апоптоза в норме и при астме (по числу лимфоцитов (в%) со сниженным МП)

		Спонтанный апоптоз			Индуцированный апоптоз (на 6 сут. по сравнению с 3 сут.)		
		3 сутки	6 сутки	Изменение:	3 сутки	6 сутки	Изменение :
Условно здоровые		21%	36%	> на 70%	20 %	54%	> на 170%
Степень тяжести	легкая	20%	42%	> на 110%	30 %	18%	< на 50%
	тяжелая	27%	30%	> на 10%	39 %	43%	> на 11%

Инкубация с Дн индуцировала снижение величины МП и появление ФС на поверхности лимфоцитов (табл. 6 и 7), однако динамика существенно различалась между лимфоцитами различных групп. Через 72 ч инкубации лимфоцитов с Дн число клеток со сниженным МП среди лимфоцитов больных atopической астмой был выше по сравнению с лимфоцитами доноров. Продолжение культивирования в питательной среде в течение 6 суток показали резистентность к развитию апоптоза с различиями в зависимости от тяжести патологии, в то время как лимфоциты здоровых лиц проявляли постепенное увеличение уровня апоптоза в этих условиях.

На начальных этапах апоптоза из-за нарушения мембранной асимметрии, наружу экспрессируется фосфатидилсерин (табл.7). Инкубация лимфоцитов с Дн приводила к повышению уровня экспрессии ФС на их поверхности через 3 суток инкубации. Продолжение культивирования в течение 6 суток также показало резистентность к развитию апоптоза как в случае с изменением величины МП.

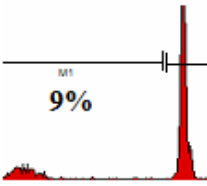
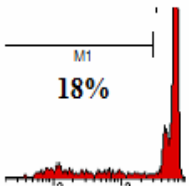
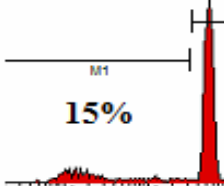
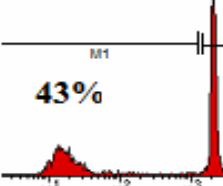
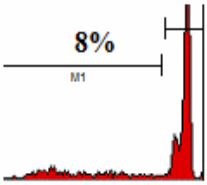
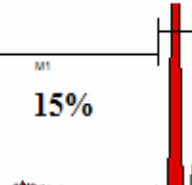
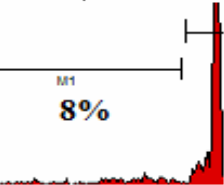
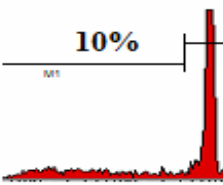
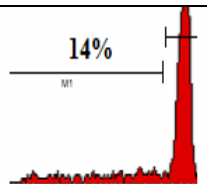
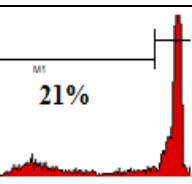
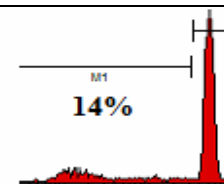
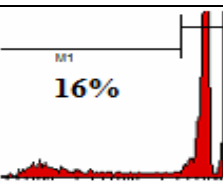
Таблица 7. Сравнение спонтанного и индуцированного апоптоза в норме и при atopической бронхиальной астме (по числу лимфоцитов с повышенной экспрессией ФС, в %)

		Спонтанный апоптоз			Индуцированный апоптоз (на 6 сут. по сравнению с 3 сут.)		
		3 сутки	6 сутки	Изменение	3 сутки	6 сутки	Изменение:
Условно здоровый		18 %	32%	>на 78%	24 %	47%	> на 96%
Форма астмы	легкая	21 %	41%	>на 95%	36 %	17%	< на 53%
	тяжелая	26 %	28%	>на 7%	39 %	42%	> на 8%

Известно, что atopическая астма сопровождается инфильтрацией бронхиального дерева клетками, мигрировавшими из кровяного русла. По истечению определенного срока они должны подвергнуться элиминации посредством запуска апоптоза. Нарушение элиминации клеток из органов-мишеней может быть связано с ослаблением экспрессии на их поверхности молекул (в частности, фосфатидилсерина), сигнализирующих об апоптозе и обеспечивающих их распознавание и последующее переваривание. Существует предположение, что причиной длительности воспаления в легких при atopической астме является не нарушение процессов регуляции апоптоза лимфоцитов, а нарушение их распознавания (Susin et al., 1999).

Слабое проявление ранних признаков апоптотического процесса в культуре лимфоцитов больных, особенно, тяжелой формой астмы как при спонтанном, так и индуцированном апоптозе на 6 сутки *in vitro* может свидетельствовать о нарушении апоптоза этих клеток и на заключительном этапе, т.е. в ядре.

Таблица 8. Изменения числа клеток (в %) на стадии позднего апоптоза *in vitro* в норме и при патологии.

	3 сутки			6 сутки		
		с Дн	Изменение:		с Дн	Изменение
З	9	15	↑ на 66 %	18	43	↑ на 190%
Л	8	8	нет	15	10	падение
Т	14	14	нет	21	16	падение
Спонтанный апоптоз				Дн-индуцированный апоптоз		
	3 сутки	6 сутки		3 сутки	6 сутки	
З						
Л						
Т						

Исследования *in vitro* (табл.8) показали не только отсутствие различий в спонтанном изменении величины МП и экспрессии ФС на поверхности лимфоцитов периферической крови исследуемых групп через 3 суток,

существенных различий не было выявлено и во фрагментации ДНК лимфоцитов. Даже при 144 часовой (в течение 6 суток) инкубации фрагментация лимфоцитов при атопии была выражена в меньшей степени или отсутствовала по сравнению с контролем.

Таким образом, нами выявлена обратная связь между количеством апоптотических клеток и тяжестью астмы.

Гибель клеток оценивали по характеру деградации ДНК, для чего из клеток выделяли ДНК фенольным методом по Кирби-Георгиеву, и проводили электрофоретическое разделение ДНК.

При анализе продуктов распада ДНК до культивирования выявлено (рис. 4), что ДНК ядер лимфоцитов больных тяжелой персистирующей астмой более деградирована, ДНК ядер лимфоцитов легкой персистирующей астмы содержит высокомолекулярные продукты (30000-50000 п.н) по сравнению с ДНК, выделенной из контрольных препаратов (примерно, 20000-25000 п.о.)

В норме, при анализе продуктов распада ДНК *in vitro* показано, что инкубация лимфоцитов без добавок в течение 3 суток вызывает слабый апоптоз. Появление низкомолекулярных продуктов деградации ДНК до 2000 п.н. отмечается на 6 сутки инкубации (рис. 4).

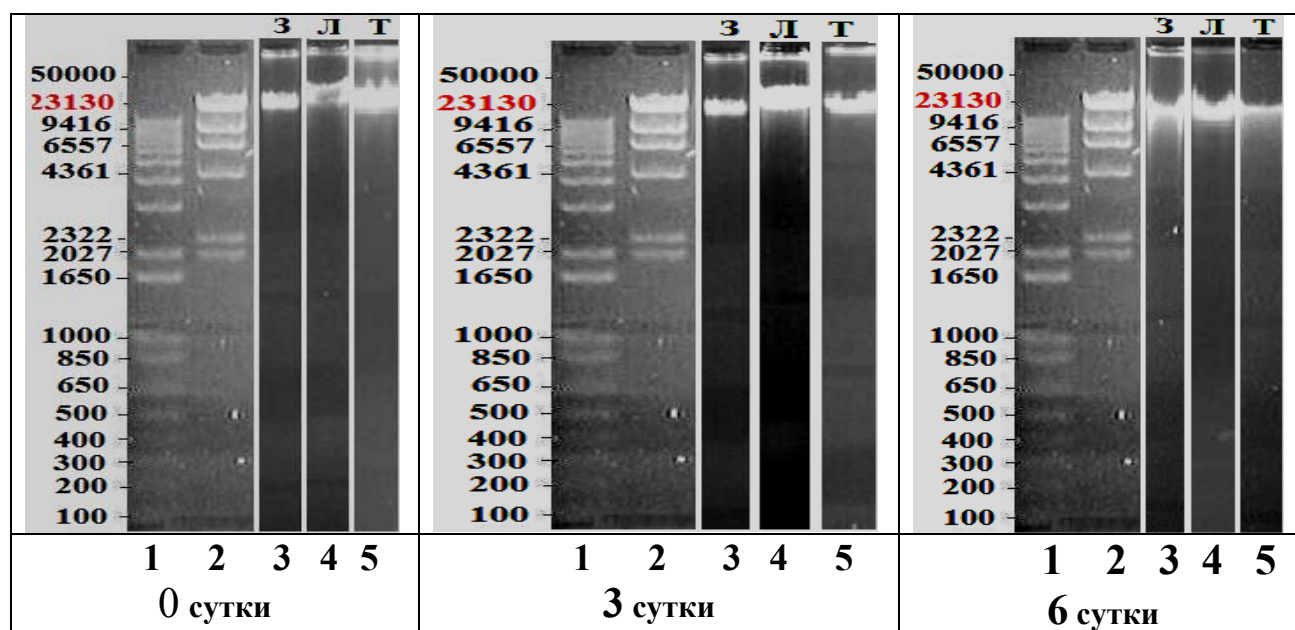


Рис. 4. Анализ степени деградации ДНК лимфоцитов *in vivo* и *in vitro* здоровых лиц (З) и больных легкой (Л) и тяжелой (Т) персистирующей астмы после 3 и 6 дней культивирования (электрофорез в 1% агарозном геле; дорожки 1,2-маркеры).

Анализ продуктов распада ДНК лимфоцитов больных астмой обнаружил слабую межнуклеосомную деградацию ДНК хроматина. Наибольшую устойчивость проявляла ДНК лимфоцитов больных легкой персистирующей астмой.

Мы показали, что добавление дексаметазона вызывает не только подавление митотической активности *in vitro*, но индуцирует комплекс реакций, приводящих к гибели клеток в норме по типу апоптоза. Лимфоциты

больных легкой персистирующей астмой резистентны к развитию апоптоза на протяжении 72 ч культивирования в питательной среде в присутствии дексаметазона (рис.5) .

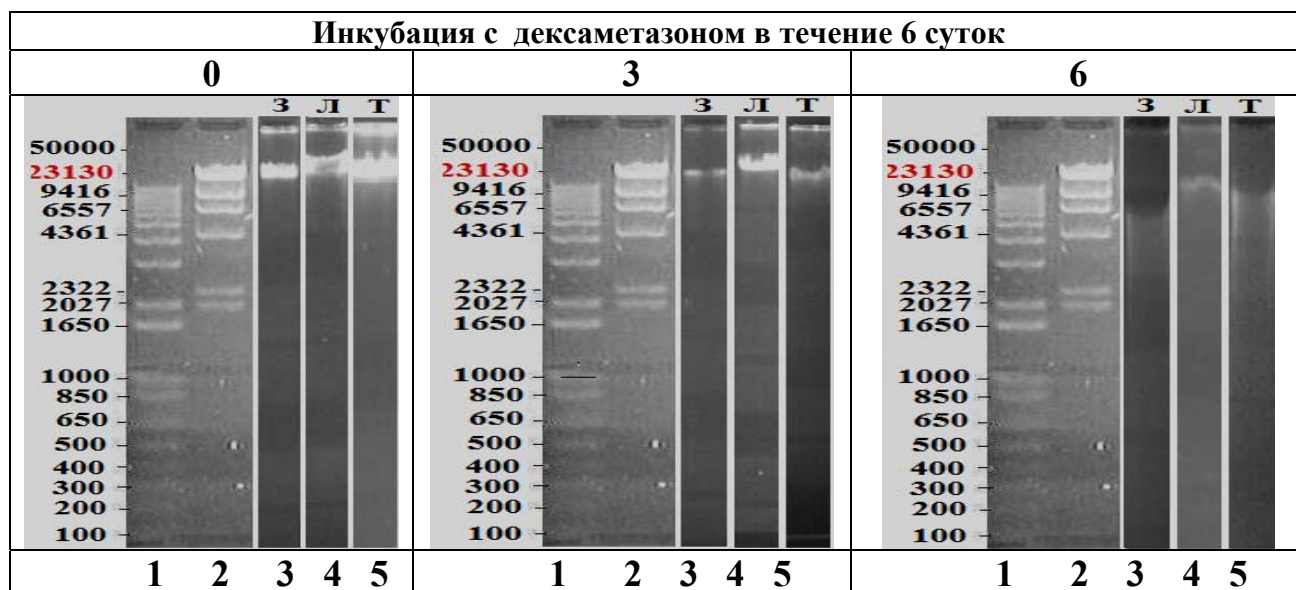


Рис. 5. Структура ДНК из лимфоцитов здоровых (З) лиц и больных астмой легкой (Л) и тяжелой (Т) формы после 3 и 6 дней культивирования с дексаметазоном .

Итак, фрагментация ДНК это одно из проявлений апоптоза на биохимическом уровне, которое реализуется в ядре клетки. По данным Brown с сотрудниками (Brown et al., 1993) высокомолекулярные фрагменты образуют два пика в районе 50 и 300 т.п.н. при разделении ДНК апоптотических клеток в пульсирующем электрическом поле. По другим данным, в норме сначала происходит образование крупных фрагментов ДНК, содержащих 700, 200-250, 50-70- т.п.н., позже 30-50 т.п.н. Полагают, что именно этот начальный этап фрагментации хроматина является ключевым событием апоптоза (Погорелов, Козинец, 1995). Следующий этап фрагментации - межнуклеосомная деградация, т.е. расщепление в результате двунитевых разрывов между нуклеосомами с формированием фрагментов, содержащих 180-200 п.о.

Исследования процесса апоптоза лимфоцитов больных АБА свидетельствует об устойчивости данных клеток к апоптозу. Однако, следует отметить тот факт, что при инкубации с Дн лимфоцитов доноров и больных астмой снижение величины МП и экспрессия ФС происходила у определенной части клеток, в то время как у остальной части лимфоцитов эти параметры не изменялись. Не все клетки перешли в апоптоз по данным оценки при окрашивании образцов йодидом пропидия. Следовательно, наряду с клетками здоровых доноров, только часть лимфоцитов больных астмой *in vitro* подвергается спонтанному и индуцированному апоптозу и способна гибнуть путем апоптоза *in vivo*. У больных тяжелой формой астмы апоптотических клеток на поздней фазе развития не более 14-21% (табл.8).

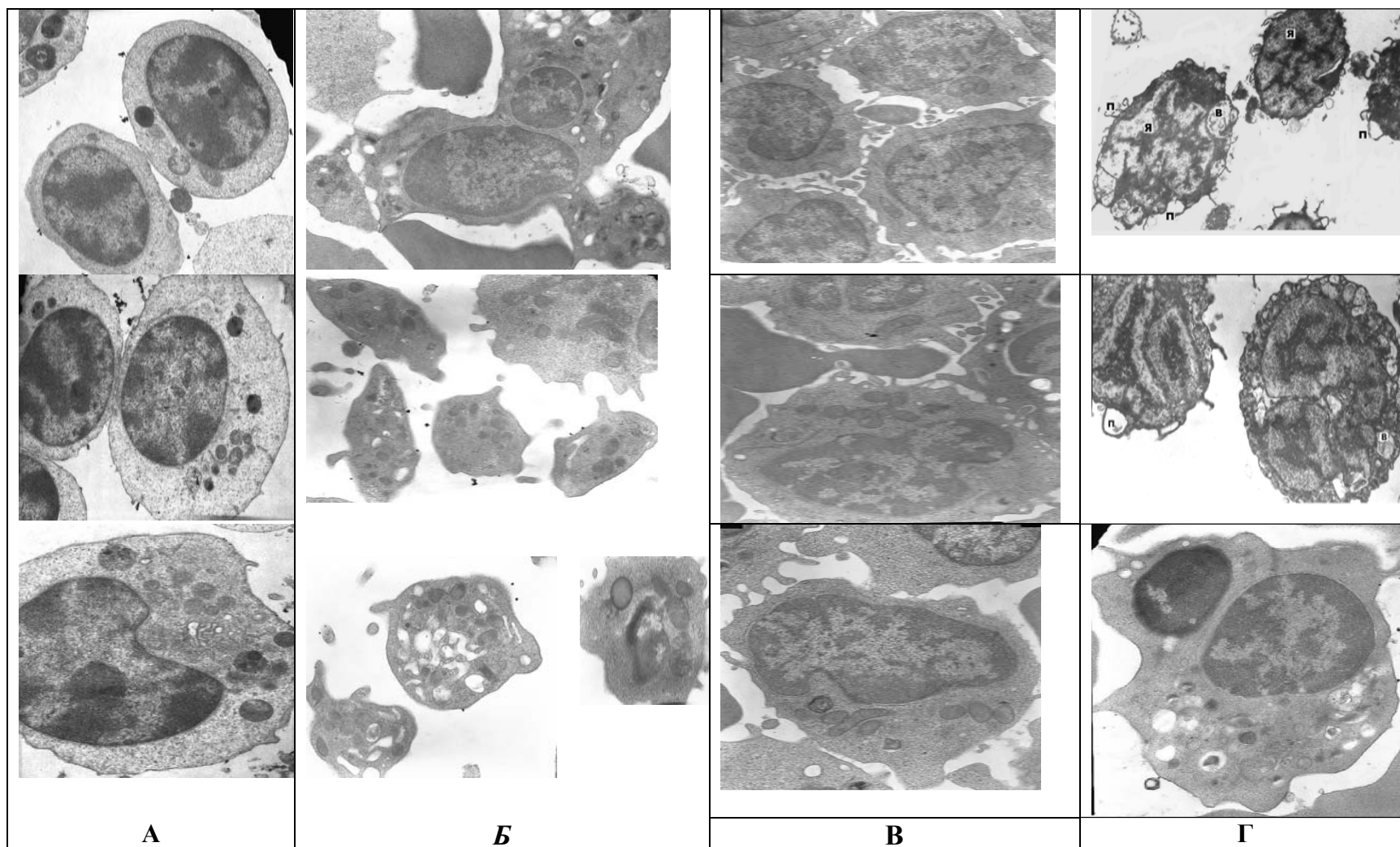


Рис. 6. Ультраструктура лимфоцитов периферической крови здоровых доноров (А), пациентов с легкой (В) и тяжелой (Г) персистирующей АБА. Б- апоптотические тельца.

Признаки апоптоза клеток наиболее выражены в лимфоцитах больных легкой персистирующей астмой (рис. 6). В составе препаратов ДНК лимфоцитов обнаружены фрагменты размером 30-50 т.п.н., присутствие которых морфологически проявляется в виде конденсации хроматина и выпячивания мембраны, характерных для апоптоза (рис. 6).

Как следует из рис. 6 при тяжелой персистирующей астме обнаружены клетки, морфология которых претерпела существенные изменения: структура выражено отличается как от здоровых клеток, так и клеток больных легкой формой АБА. Обнаруживаются глубокие вдавливания ядерных мембран, ядра приобретают лопастной вид, обычно далее происходит его коллапс вплоть до фрагментации последних. На клеточной мембране появляются выпячивания и пузыри - «блеббинги». Развитие блеббинга мембраны представляет собой результат нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий вследствие активации специфических ферментативных реакций, окислительного повреждения белков цитоскелета, развития примембранного энергетического и ионного дисбаланса, целостность мембран часто не нарушена. В периферической крови больных легкой персистирующей астмой можно обнаружить везикулы, так называемые апоптотические тельца.

Наиболее принципиальным достижением последних лет (Манских, 2007) в изучении программируемой клеточной гибели явилось установление программируемого характера биохимических изменений, приводящих к некрозу (Okada, Mak, 2004; Проскуряков и др., 2002). В связи с этим в современной классификации ПКГ апоптоз получил название «ПКГ I типа», а некроз - «ПКГ III типа»; «ПКГ II типа» представлен аутофагией. В настоящее время на первый план выходят различия в последствиях апоптоза и некроза для окружающих живых клеток и организма. Апоптоз заканчивается «аккуратным» фагоцитозом без последствий в виде альтерации, воспаления и иммунного ответа (Degenhardt et al., 2006). Гибель клетки по типу некроза всегда сопровождается развитием альтерации окружающих клеток и воспалением, а фагоцитоз погибших клеток - развитием полноценного иммунного ответа, если в них есть антигены (Проскуряков, и др., 2002). Эти различия весьма важны для патологии. Морфологическими признаками некроза является набухание клеток и мембранных органелл, неспецифическая компактизация хроматина, вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности мембран. Понятие «программируемый некроз» сформировалось на основании данных, что существует сигнальный путь инициации некроза в ответ на связывание рецепторами молекул TNF, на фоне подавления апоптоза (Fiers et al., 1999). По данным (Edinger, Thompson, 2004) механизм апоптоза направлен, в том числе, и на подавление ферментов, активность которых может приводить к запуску некроза. Отрицательная связь между апоптозом и программированным некрозом прослеживается и при повреждении ДНК. В неопухолевых клетках в этих случаях включаются пункты проверки, действующие в интерфазе клеточного цикла и предотвращающие вступление в митоз клеток с нарушенным геномом (Rieder, Khodjakov, 1997). В случае нарушения механизма

репарации клетки погибают путем апоптоза. Однако, если в таких клетках с поврежденной ДНК нарушены механизмы апоптоза, клетки погибают путем программируемого некроза. Физиологическое значение некроза в такой ситуации имеет двоякий смысл. С одной стороны программируемая гибель клеток путем некроза в отсутствии апоптоза все же снижает риск передачи дочерним клеткам мутаций (Edinger, Thompson, 2004). С другой стороны, распад клеток при некрозе может способствовать активации иммунного ответа многоклеточного организма. Это может выражаться при выработке аутоантител к ДНК, что показано нами ранее (Курбанов и др., 2007).

Следует отметить, что при определенных условиях процесс реализации одной программы гибели на каких-то этапах может смениться, например, начавшаяся аутофагия может смениться апоптозом, а апоптоз завершиться постапоптотическим некрозом.

Таким образом, выявленные биохимические и морфологические нарушения на уровне лимфоцитов и цитогенетические на уровне эритроцитов могут быть новыми интегративными критериями при установлении тяжести течения заболевания, в частности, атопической бронхиальной астмой.

Выводы:

1. Установлена обратная корреляционная зависимость между количеством лимфоцитов периферической крови и степенью тяжести заболевания *in vivo*.

2. Степень нарушения ультраструктуры лимфоцитов коррелирует с тяжестью астмы.

3. Степень нарушения апоптоза лимфоцитов отражает степень тяжести заболевания;

а. у больных легкой и средней персистирующей астмой на фоне торможения апоптоза повышается количество пролиферирующих лимфоцитов (отмечается лимфопрролиферативный эффект).

б. для лимфоцитов больных тяжелой персистирующей астмой характерно нарушение клеточного деления лимфоцитов (митотической активности).

4. Начальные этапы апоптоза, выраженные через взаимосвязь между числом клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и экспрессией фосфатидилсерина на поверхности Т-лимфоцитов не претерпевают серьезных отличий в норме и при атопической бронхиальной астме.

5. Нарушения апоптоза связаны с заключительным этапом, происходящем в ядре. У больных с тяжелой персистирующей астмой апоптоз идет по пути программированного некроза.

6. Высокое число эритроцитов с микроядрами, коррелирующее с тяжестью астмы, свидетельствует о сильном прессинге эндомутагенов на геном форменных элементов крови (в частности эритроцитов).

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Нсангу, М.М.Д. Особенности морфологических показателей и количественной оценки лимфоцитов периферической крови больных

атопической бронхиальной астмой / М.М.Д. Нсангу, А.С. Водунон, З.И. Абрамова, А.В. Лунцов, В.Н. Цибулькина // Казанский медицинский журнал.- 2007.-Т.88, № 2.-С.182-185.

2. Водунон, А.С. Влияние дексаметазона на степень деградации ДНК лимфоцитов больных Атопической Бронхиальной Астмой./ А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Сб. тез./II-й международный молодежный медицинский конгресс.- Санкт-Петербург, 2007.-С.18.

3. Пинчук, Ю.В. Биохимические и морфологические изменения лимфоцитов при апоптозе у больных атопической бронхиальной астмой/ Ю.В. Пунчук. А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Сб. тез./II-й международный молодежный медицинский конгресс. -Санкт-Петербург, 2007.-С.17.

4. Водунон, А.С. Интенсивность анеугенеза у больных атопической бронхиальной астмой / А.С. Водунон, З.И. Абрамова //Сб. тез. /IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. -Новосибирск, 2008. -С.447.

5 Пинчук, Ю.В. Особенности биохимических и морфологических показателей лимфоцитов при апоптозе у больных атопической бронхиальной астмой/ Ю.В. Пунчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Сб. тез./IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, 2008. С.439.

6. Водунон, А.С. Цитогенетические изменения в эритроцитах больных атопической бронхиальной астмой / А.С. Водунон, Н.А. Пономарева, З.И. Абрамова // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия «Естественные науки».- 2008.-Т.150, Кн. 3.-С.101-105.

7. Пинчук, Ю.В. Биохимические и морфологические изменения лимфоцитов при апоптозе у больных атопической бронхиальной астмой/ Ю.В.Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова, М.М.Д. Нсангу, И.Г. Мустафин, А.А.Пономарева // Вестник Оренбургского государственного университета, 2008- № 11.- С.156-161.

8. Пинчук, Ю.В. Морфологические нарушения апоптоза лимфоцитов больных атопической бронхиальной астмой / Ю.В.Пинчук, А.С. Водунон, З.И. Абрамова // Сб. тез. /II-я Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии».- Казань, 2008. - С.104.